Microarray와 Network 분석을 통한 병원균 및 스트레스 저항성 관련 주요 유전자의 대량 발굴

김형민 · 문수윤 · 이진수 · 배원실 · 원경호 · 김윤경 · 강권규 · 류호진

Identification of multiple key genes involved in pathogen defense and multi-stress tolerance using microarray and network analysis

Hyeongmin Kim · Suyun Moon · Jinsu Lee · Wonsil Bae · Kyungho Won · Yoon-Kyeong Kim · Kwon Kyoo Kang · Hojin Ryu

Received: 16 August 2016 / Revised: 16 August 2016 / Accepted: 27 August 2016

© Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Brassinosteroid (BR), a plant steroid hormone, plays key roles in numerous growth and developmental processes as well as tolerance to both abiotic and biotic stress. To understand the biological networks involved in BR-mediated signaling pathways and stress tolerance, we performed comparative genome-wide transcriptome analysis of a constitutively activated BR *bes1-D* mutant with an Agilent *Arabidopsis* 4 x 44K oligo chip. As a result, we newly identified 1,091 (562 up-regulated and 529 down-regulated) significant differentially expressed genes (DEGs). The combination of GO enrichment and protein network analysis revealed that stress-related processes, such as metabolism, development, abiotic/biotic stress, immunity, and defense, were critically linked to BR signaling pathways. Among the identified gene sets, we confirmed more than a 6-fold up-regulation of *NB-ARC* and *FLS2* in *bes1-D* plants.

However, some genes, including *TIR1*, *TSA1* and *OCP3*, were down-regulated. Consistently, BR-activated plants showed higher tolerance to drought stress and pathogen infection compared to wild-type controls. In this study, we newly developed a useful, comprehensive method for large-scale identification of critical network and gene sets with global transcriptome analysis using a microarray. This study also showed that gain of function in the *bes1-D* gene can regulate the adaptive response of plants to various stressful conditions.

Keywords Brassinosteroid, Plant stress tolerance, Pathogen, Network analysis

서 언

브라시노스테로이드는 식물에서 발견되는 유일한 스테로이드 계통의 호르몬으로 식물의 길이 생장, 개화, 뿌리 발달, 관다발 발달, 광 형태 형성, 과실의 성숙 및 후숙, 스트레스 저항성 증진 등 life cycle에 있어서 매우 중요한 생리 활성 조절 물질이다(Kim and Wang 2010; Kutschera and Wang 2012; Wang et al. 2012). 최근 들어 애기장대 및 벼를 중심으로 브라시노스테로이드에 대한 연구는 식물세포내에서 어떻게 인식이 되고, 신호전달되어 다양한 생리현상을 일으키는지에 대한 중요한 정보를 제공하고 있다(Choudhary et al. 2012). 브라시노스테로이드는 생체막에 존재하는 수용체 복합체인 BRI1/BAK1 의해 인식이 되어 신호 개시가 일어난다. 브라시노스테로이드의 인식은 복합체를 이루고 있는 두 수용

H. M. Kim · S. Y. Moon · J. S. Lee · W. S. Bae · H. J. Ryu (✉)
충북대학교 자연과학대학 생물학과
(Department of Biology, Chungbuk National University,
Cheongju, 28644, Korea)
e-mail: hjryu96@chungbuk.ac.kr

K. H. Won · Y.-K. Kim
농촌진흥청 국립원예특작과학원 배연구소
(Pear Research Institute, National Institute of Horticultural &
Herbal Science, Rural Development Administration, Naju, 58126,
Korea)

K. K. Kang (✉)
국립한경대학교 원예학과
(Department of Horticulture, Hankyong National University,
Ansung, Gyeonggi-do 456-749, Korea)
e-mail: kykang@hknu.ac.kr

체 단백질 BRI1과 BAK1에 인산화를 유도하게 되고, BSU1 탈인산화효소의 활성화를 통해 신호전달의 주요 억제인자 BIN2의 기능을 억제하게 된다(Choudhary et al. 2012; He et al. 2002; Li and Chory 1997; Li et al. 2002; Vriet et al. 2012; Wang et al. 2012). BIN2는 신호가 없을 때 브라시노스테로이드 신호전달의 주요 BES1과 BZR1의 인산화를 유도하게 되고, 인산화된 전사인자들은 세포질로 이동하여 유전자의 발현을 유도하지 못하게 됨으로써 신호를 억제하게 된다(Ryu et al. 2007; 2010a; 2010b). 하지만 신호전달의 활성화를 통해 BIN2의 기능이 억제되게 되면, BES1/BZR1의 탈인산화가 유도되게 되고, 탈인산화된 전사인자들은 핵으로 이동하게 된다(Gampala et al. 2007; Ryu et al. 2007). 탈인산화에 의해 핵으로 이동된 전사인자들은 TPL-HDA19 단백질과 복합체를 형성하여 다양한 브라시노스테로이드 신호전달에 관여하는 유전자들의 발현을 조절한다고 하였다(Oh et al. 2014; Ryu et al. 2014). 실제로 전사인자 BES1과 BZR1에 진화적으로 보존된 PEST 도메인에 존재하는 Proline 잔기가 Leucine으로 변경된 돌연변이체(*bes1-D*와 *bzr1-1D*)에서는 인산화가 잘 이뤄지지 않으며, 아주 강력한 브라시노스테로이드 신호가 전달된다고 보고하였다(Wang et al. 2002; Yin et al. 2002). 이러한 신호전달 메커니즘에 의해 활성화되는 유전자들은 주로 식물의 발달, 브라시노스테로이드 생합성, 호르몬의 신호전달 상호작용 등에 관여하는 것으로 알려져 있을 뿐 많은 정보가 없는 실정이다. 최근 들어 분자생리학적 연구 기법을 통해 브라시노스테로이드가 다양한 환경스트레스 및 병 저항성에 관여하고 보고 되었다(Choudhary et al. 2012). 토마토, 벼, 애기장대와 같은 식물에 외부에서 브라시노스테로이드를 처리하게 되면 염, 가뭄, 열, 냉해, 산화 등과 같은 비생물학적 스트레스에 대한 광범위 저항성이 향상되었다(Divi and Krishna 2009; Divi et al. 2010; Gendron and Wang 2007; Kagale et al. 2007). 이러한 브라시노스테로이드의 생리적 특성을 이용하여 농업현장에서 직접 적용하는 농업이 시도되고 있으나, 호르몬 합성 비용 및 생합성과정상의 어려움 때문에 널리 전파되고 있지 않다. 이러한 사실을 종합해볼 때 외부에서 공급되는 브라시노스테로이드는 식물이 지니는 canonical 신호전달 체계를 이용하여 광범위 스트레스 내성을 증대시키는 것으로 설명하고 있다. 현재까지 브라시노스테로이드에 의해 조절되는 다양한 식물의 생장과 발달에 관여하는 유전자들의 분리 동정은 이뤄졌지만, 이들 처리를 통해 광범위 스트레스 내성에 관여하는 유전자들에 대한 연구는 거의 이뤄지지 않고 있다. Microarray 및 Next Generation Sequencing (NGS)을 기반으로 한 빅 데이터 분석은 단편적인 유전자들의 발현 조절 양상을 넘어서 시스템적으로 어떻게 유전자들의 발현 양상이 변화하는가를 확인함으로써 다양한 변화를 확인할 수 있다(Harnsomburana et al. 2011; Lee et al. 2015a). 따라서 본 연구에서는 애기장대에서 브라시노스테로이드 신호전달이 활성화 되어 있는

bes1-D 돌연변이체의 microarray 분석을 수행하여 전사체 레벨에서 유전자 발현 양상을 분석하였다. 발현 차이를 보인 1,091개 유전자들은 Gene Ontology와 단백질 네트워크 분석 등을 통해 브라시노스테로이드 신호전달에 의해 조절되는 네트워크 유전자들 및 광범위 스트레스 내성에 관여하는 주요 유전자들을 동정하여 고찰하였다.

재료 및 방법

식물 생장 및 Total RNA 분리, cDNA 합성 및 qRT-PCR

본 실험에 사용한 애기장대(*Arabidopsis thaliana*)는 야생형 En-2 및 브라시노스테로이드 활성 돌연변이 *bes1-D* 계통을 포트에 파종하여 22°C, 16hr 명조건/8hr 암조건의 온실에서 생장시켰다. Total RNA 분리는 어린 잎으로부터 Total RNA extraction kit (Intron Biotech, Korea)를 이용하여 제공된 실험 방법에 따라 분리하였다. 분리된 total RNA는 MS 3000 Nano-drop (Bio-red, USA)으로 농도 및 QC를 진행하여 실험에 공시하였다. Total RNA는 Microarray 분석에 이용하였다. Real-time quantitative PCR을 수행하기 위해 Oligo (dT) primer를 사용한 cDNA를 합성하였다. cDNA는 1st strand synthesis KIT (Enzymomics, Korea)를 이용하여 합성하였다. Total RNA의 2 µg을 이용하였으며 합성 조건은 50°C에서 60분 동안 반응시킨 후 1분간 얼음에 냉각시켜 first strand cDNA 합성을 완성하였다. qRT-PCR 분석은 cDNA를 사용하여 SYBR Green Real-time PCR Master Mix (Applied Biosystem, USA)를 사용하여 Quant Studio 3 (Applied Biosystem, USA) 장비를 사용하여 권장하는 방법에 의해 수행하였다. 본 연구에 사용된 primer sequence 정보는 Table 5에 나열하였다. Threshold cycle (Ct) 값에 의한 발현량 분석은 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 으로 계산하였으며, $\Delta\Delta Ct$ 은 처리식물체의($Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{actin gene}}$) - 대조식물체의($Ct_{\text{target gene}} - Ct_{\text{actin gene}}$)에 의해 계산하여 수치화 하였다(Livak and Schmittgen 2001).

Microarray 분석

애기장대(*Arabidopsis thaliana*) 야생형 En-2, 브라시노스테로이드 활성 돌연변이 *bes1-D*에 대한 transcript의 발현 양상을 규명하기 위해 대조구인 야생형과 *bes1-D* 유식물에서 RNA를 추출한 후, microarray 분석을 3반복으로 수행하여 발현 차이를 분석하였다. 타겟 probes와 hybridization은 Agilent's Low RNA Input Linear Amplification kit (Agilent Technology, USA)을 사용하였으며, Microarray 분석을 위한 chip은 상용화 되고 있는 Agilent Arabidopsis 4 x 44K Oligo microarray를 사용하여 hybridization 후, image quantification은 GenePix Pro 4.0을 사용하였고, LOWESS 프로그램을 이용하여 각 spot의 normalization

을수행하였다. 분석 프로그램은 Agilent GeneSpringGX 7.3을 사용하였으며, Hybridization은 각각 3 반복으로 수행되었다.

Gene Ontology (GO)와 Gene network 분석

Microarray 분석을 통해 얻어진 1,091개의 DEGs으로부터 주요 생물학적 기능을 분석하기 위해 GO enrichment analysis 분석과 단백질 간 상호작용 네트워크 분석을 수행하였다(Ashburner et al. 2000). Gene Ontology Consortium website (<http://geneontology.org/page/go-enrichment-analysis>)에서 제공하는 프로그램을 이용하여 biological process, molecular function 및 cellular component에 해당하는 카테고리를 분리하였다(Supek et al. 2011). GO-Slim 카테고리는 TAIR database (<https://www.arabidopsis.org>)에서 제공되는 데이터를 이용하였다. GO enrichment analysis 분석을 통해 분리된 스트레스 관련 유전자들로부터 주요 역할을 수행하는 유전자를 추출하기 위해 단백질 상호작용 네트워크 분석을 수행하였다(Shannon et al. 2003). 단백질 네트워크의 기본 데이터는 AraNet v2 (Lee et al. 2015b)에서 제공받아 사용하였고, 네트워크 작성은 Cytoscape network visualization tool (Shannon et al. 2003)을 이용하였다. 유전자의 이름은 TAIR database를 이용하여 결정하였다.

식물 스트레스 처리 및 저항성 검정

식물의 drought 내성 및 병 저항성 검증을 위해 브라시노스테로이드 전사인자의 기능 획득 돌연변이 *bzr1-1D*, *bes1-D* 식물체를 이용하였다. Drought 내성에 대한 실험을 하기 위

해 3주간 생장시킨 야생형과 *bzr1-1D* 돌연변이계통에 급수를 중단하고 12일 후 다시 급수하여 식물이 회복되는 정도를 확인하였다. 병 저항성을 실험하기 위해 4주간 온실에서 생장시킨 식물체에 *Pseudomonas syringae* pv. Tomato strain DC3000 (*Pst* DC3000)을 5×10^7 /ml 농도로 침지 처리하였다. 병원균 접종 후 7일 후 잎의 발생단계별로 진열하여 병의 진행 유무를 확인하였다.

결과 및 고찰

브라시노스테로이드 신호전달 과정에 관여하는 유전자를 동정하기 위해 En-2 계통과 *bes1-D* 계통을 이용하여 microarray 분석한 결과 통계적으로 유의성이 나타나는 *p*-value가 0.01 이하와 2배이상의 발현량 차이를 보이는 유전자(DEGs) 총 1,091개를 추출하였다(Fig. 1). 그 중 En-2 계통에 비해 *bes1-D* 계통에서 발현량이 증가를 보인 유전자는 총 562개 이었고, 발현량이 감소를 보인 유전자는 총 529개 이었다(Fig. 1, Table 1, Table 2). 총 1,091개의 DEGs으로부터 주요 생물학적 기능을 분석하기 위해 GO enrichment analysis 분석을 수행한 결과 GO 분석을 통해 브라시노스테로이드 전사인자의 활성화는 3,185개의 cellular component, 2,217개의 molecular function 그리고 3,082개의 biological process로 구분되었다(Fig. 2). Biological process에 포함되는 유전자들은 다시 11개의 기능별로 구분이 되었으며, 현재까지 그 기능이 정확하게 구분되지 않는 term이 약 50% 정도를 차지하고 있었다. 이러한 이유는 NGS에 의해 발견하고 있는 유전체 서열 분

Fig. 1 Microarray analysis of various genes in WT : BR activating plant. Heatmap of the z-scores of DEGs between En-2 and *bes1-D*. The heatmap was generated by the Plotly website (<https://plot.ly/alpha/workspace/>). High and low scores are indicated in red and blue, respectively. DEGs are scaled to Z-scores of the rows

Table 1 List of up-regulated DEGs

UP-regulated gene list(562)									
AT1G72930	AT3G57470	AT5G27110	AT5G50100	AT4G19030	AT2G14820	AT1G17960	AT4G14450	AT3G11385	AT3G45680
AT5G64400	AT2G14660	AT4G10800	AT5G24670	AT5G27010	AT1G30795	AT3G16370	AT3G07180	AT3G62510	AT2G14800
AT5G45500	AT5G02500	AT4G06627	AT5G38020	AT1G05440	AT1G08165	AT2G18170	AT1G12845	AT4G08620	AT3G20130
AT2G25450	AT5G37940	AT1G31814	AT4G13495	AT1G05770	AT5G58120	AT2G38180	AT1G61420	AT1G23550	AT2G26560
AT5G42850	AT4G12310	AT5G24350	AT3G62530	AT4G26140	AT5G23930	AT1G63540	AT3G56080	AT5G03390	AT2G28830
AT3G60950	AT4G13560	AT1G53440	AT3G13437	AT3G18830	AT4G31990	AT2G19910	AT4G10280	AT2G15910	AT3G03702
AT3G32120	AT2G21860	AT5G02670	AT4G19520	AT2G25460	AT5G46470	AT2G41190	AT2G40300	AT3G09450	AT5G26320
AT2G27402	AT5G59690	AT3G07800	AT5G60060	AT4G23490	AT5G06390	AT4G29103	AT4G00990	AT2G30942	AT4G23310
AT5G45490	AT2G38620	AT1G50290	AT5G08630	AT2G17240	AT3G11930	AT1G62910	AT1G31335	AT1G12080	AT2G17280
AT5G45430	AT2G05117	AT1G01670	AT4G16950	AT5G37970	AT3G45290	AT3G14450	AT1G76820	AT1G10540	AT4G30660
AT2G15555	AT2G16530	AT5G65207	AT1G78970	AT5G48530	AT1G70810	AT1G32920	AT1G12220	AT1G68910	AT1G32375
AT2G05830	AT1G58235	AT1G13430	AT3G59890	AT3G51230	AT4G28085	AT2G26970	AT2G41480	AT5G43450	AT2G40340
AT4G16215	AT5G54020	AT2G25670	AT1G58180	AT5G45469	AT5G51930	AT1G64105	AT3G50880	AT1G16880	AT1G58300
AT5G65950	AT5G27360	AT3G26240	AT3G58220	AT2G15580	AT4G08093	AT1G61490	AT1G78050	AT5G54060	AT3G43440
AT3G29410	AT4G16980	AT2G41640	AT1G31820	AT3G46880	AT3G58020	AT3G43610	AT3G23800	AT1G24490	AT1G03850
AT2G13665	AT1G65970	AT5G42720	AT5G03495	AT4G21370	AT3G47580	AT3G53350	AT1G58520	AT3G55910	AT1G16030
AT1G61180	AT5G59660	AT1G22590	AT3G56890	AT5G60460	AT5G46640	AT2G41340	AT1G02820	AT4G31730	AT5G38010
AT5G33251	AT5G18010	AT1G62860	AT3G08860	AT3G14395	AT4G13970	AT5G18245	AT5G36870	AT4G36110	AT4G23270
AT3G21080	AT2G34300	AT4G21650	AT5G28000	AT1G30720	AT3G44970	AT5G15790	AT2G18780	AT3G29290	AT1G35255
AT3G11880	AT2G02770	AT3G04330	AT5G44430	AT1G32310	AT3G18980	AT3G29100	AT2G35075	AT1G53460	AT4G29610
AT2G43550	AT3G60965	AT1G78030	AT4G13564	AT1G77590	AT1G49030	AT3G61028	AT3G50160	AT4G09420	AT2G35270
AT4G15242	AT2G32550	AT2G13431	AT5G42800	AT3G60300	AT4G10050	AT2G03200	AT3G19930	AT4G36930	AT3G18450
AT5G34850	AT4G20480	AT4G27370	AT3G58820	AT4G22212	AT4G12680	AT2G18360	AT2G36800	AT2G03390	AT5G59090
AT5G03370	AT1G47380	AT2G02580	AT2G27389	AT1G48070	AT5G37890	AT1G10155	AT4G01430	AT5G18770	AT5G49770
AT4G19240	AT3G60960	AT2G05915	AT2G11270	AT5G10760	AT4G14620	AT4G12020	AT3G13400	AT3G02240	AT2G35810
AT4G23290	AT3G45070	AT5G40942	AT5G38000	AT2G23960	AT1G33970	AT2G21520	AT2G21185	AT1G30835	AT2G39830
AT1G22800	AT4G09500	AT5G37072	AT3G13440	AT5G45420	AT5G50110	AT5G40170	AT3G19508	AT3G21090	AT3G44790
AT4G22210	AT3G19515	AT1G13460	AT1G65200	AT5G23380	AT1G66900	AT1G24020	AT4G15070	AT5G49520	AT1G74170
AT2G20180	AT3G22570	AT3G50300	AT4G23260	AT1G17300	AT5G56590	AT2G23600	AT2G21620	AT1G43890	AT4G19700
AT4G14630	AT1G66700	AT1G53340	AT1G31940	AT5G53970	AT4G38850	AT2G02630	AT4G21730	AT5G43570	AT4G30020
AT1G29800	AT1G62610	AT2G36590	AT4G29200	AT3G60980	AT2G04110	AT5G48880	AT1G34750	AT5G63080	AT1G64270
AT5G66590	AT4G14390	AT5G27100	AT1G65350	AT4G16890	AT2G12550	AT5G08460	AT1G47820	AT5G02060	AT4G06701
AT1G29790	AT5G59680	AT3G58270	AT2G29660	AT3G62730	AT4G01525	AT3G12965	AT5G57700	AT1G67460	AT3G58780
AT5G42825	AT3G61010	AT1G72920	AT5G28010	AT4G23520	AT1G30784	AT5G59650	AT3G26320	AT4G01350	AT3G53310
AT5G05890	AT4G20390	AT4G20450	AT2G41650	AT5G24210	AT1G74640	AT2G28800	AT4G11500	AT3G08870	AT5G45000
AT4G24420	AT4G14650	AT5G19230	AT5G46590	AT3G54340	AT3G51660	AT3G50960	AT5G09710	AT1G06950	AT2G31370
AT4G23320	AT3G30214	AT4G22390	AT4G09680	AT4G10400	AT1G32090	AT2G24310	AT1G73550	AT1G65032	AT1G23780
AT3G44430	AT5G49500	AT3G27420	AT5G50790	AT3G21010	AT1G70260	AT3G27400	AT4G09320	AT5G09810	AT1G21460
AT1G65985	AT2G28990	AT5G43940	AT4G21590	AT5G41000	AT3G26180	AT5G23570	AT4G02550	AT1G50180	AT2G35690
AT5G25250	AT2G23985	AT2G14095	AT4G29990	AT5G20630	AT4G38545	AT3G16200	AT3G03070	AT1G31720	AT3G62860
AT1G56680	AT3G21020	AT1G67481	AT3G45700	AT3G02850	AT4G12000	AT3G03040	AT2G17710	AT2G24160	AT1G59840
AT5G40920	AT4G12917	AT4G12870	AT3G18485	AT4G00880	AT1G65730	AT1G11540	AT1G22150	AT2G14080	AT5G13210
AT4G23300	AT5G27120	AT5G42890	AT3G60480	AT5G26300	AT5G54710	AT5G44030	AT1G60130	AT2G02620	AT5G46260
AT5G21105	AT4G21220	AT3G05400	AT2G29525	AT1G17860	AT3G43510	AT5G46500	AT3G27095	AT3G60080	AT4G34900
AT2G05995	AT1G47786	AT5G37980	AT3G15380	AT2G13960	AT4G19350	AT4G17260	AT5G53240	AT1G64100	AT1G11803
AT3G25440	AT3G29430	AT3G17950	AT5G48580	AT4G16530	AT5G39090	AT5G63595	AT2G21195	AT4G15390	AT4G27890
AT4G17470	AT5G44575	AT5G11780	AT1G07660	AT2G45360	AT5G58575	AT4G08950	AT4G02700	AT3G16565	AT3G01345
AT5G24060	AT3G03855	AT3G59930	AT5G24200	AT5G18360	AT1G34050	AT2G39530	AT5G33355	AT5G45840	AT1G12780
AT4G15210	AT5G38005	AT5G60370	AT4G19633	AT1G35680	AT2G28970	AT1G27980	AT1G70895	AT3G27906	AT1G60750
AT5G35935	AT3G19370	AT3G45000	AT2G14475	AT3G60940	AT3G24255	AT3G28880	AT2G15318	AT4G37370	
AT3G27520	AT3G61020	AT3G28190	AT2G21187	AT1G67570	AT1G04580	AT1G78760	AT1G73120	AT4G39590	
AT4G15955	AT1G24145	AT5G09470	AT1G05680	AT1G15380	AT4G17030	AT1G69050	AT4G27380	AT1G20130	
AT1G57610	AT4G01450	AT3G58865	AT5G40910	AT5G41740	AT5G53230	AT3G12430	AT1G64780	AT1G02940	
AT3G25790	AT3G57260	AT2G41880	AT2G29670	AT1G67860	AT3G29000	AT1G05420	AT3G44716	AT1G58420	
AT2G02120	AT4G16770	AT3G16520	AT4G09260	AT3G26730	AT3G08590	AT5G59540	AT2G14878	AT2G25720	
AT1G47530	AT4G31980	AT2G02680	AT2G24960	AT3G51330	AT1G27190	AT5G41870	AT3G23470	AT5G51160	
AT5G24950	AT1G30975	AT2G11891	AT1G11570	AT3G12460	AT1G78820	AT3G50845	AT4G13540	AT5G27990	

Table 2 List of down-regulated DEGs

DOWN-regulated gene list(529)									
AT3G46040	AT1G60110	AT5G44920	AT2G26370	AT3G13980	AT2G31490	AT5G43520	AT4G21903	AT5G18404	AT5G56980
AT3G16450	AT3G59880	AT2G43590	AT1G66930	AT1G59620	AT5G53050	AT5G08590	AT5G53110	AT2G30880	AT4G36780
AT5G25980	AT5G53048	AT3G30122	AT5G56747	AT5G18340	AT3G01540	AT1G05350	AT5G66270	AT1G69310	AT3G04000
AT3G28899	AT4G01593	AT5G24770	AT3G52680	AT1G49930	AT4G01390	AT1G63040	AT3G28940	AT4G36910	AT2G35635
AT5G11280	AT5G39080	AT4G19840	AT5G02690	AT1G76640	AT1G58270	AT1G74430	AT5G66220	AT4G23600	AT5G09650
AT1G53480	AT2G10900	AT1G63870	AT5G45220	AT5G23405	AT2G23130	AT1G27390	AT3G58930	AT1G01520	AT3G21330
AT4G12545	AT5G48010	AT5G17090	AT5G46150	AT2G05642	AT1G31460	AT2G28120	AT5G03180	AT1G70870	AT5G45740
AT3G11700	AT2G05185	AT4G16920	AT3G49620	AT1G45616	AT3G50660	AT1G18710	AT4G18580	AT5G01110	
AT2G15128	AT5G44570	AT1G60810	AT1G19396	AT5G51620	AT2G18040	AT4G27260	AT3G51450	AT4G02130	
AT2G26740	AT5G23955	AT3G43690	AT1G59218	AT3G01329	AT1G64240	AT1G34047	AT1G77230	AT2G20700	
AT3G01720	AT5G51630	AT2G24280	AT4G38280	AT2G07213	AT3G13730	AT5G57780	AT3G01010	AT1G22350	
AT1G23940	AT1G65040	AT4G22610	AT5G23840	AT2G47560	AT5G35490	AT3G28956	AT5G61590	AT2G20950	
AT1G52990	AT2G44160	AT3G47965	AT5G24960	AT1G31070	AT1G35375	AT1G19090	AT1G47960	AT1G10000	
AT5G38690	AT1G17940	AT5G47990	AT4G01680	AT4G16845	AT1G35515	AT3G44480	AT1G52410	AT3G17626	
AT5G02160	AT3G47290	AT1G80970	AT5G04120	AT4G16710	AT3G03470	AT3G59010	AT5G09978	AT1G54580	
AT2G16367	AT1G31170	AT3G21950	AT3G46730	AT5G08600	AT2G01830	AT5G11230	AT5G64110	AT4G18300	
AT2G05510	AT4G22120	AT5G18290	AT1G49630	AT3G30180	AT3G24890	AT4G25710	AT2G02470	AT5G46295	
AT5G58590	AT4G05631	AT1G58602	AT1G66510	AT3G20940	AT4G13330	AT3G04650	AT1G61170	AT3G51110	
AT4G34881	AT1G57800	AT3G11010	AT5G23010	AT1G68620	AT5G46240	AT4G24972	AT4G10410	AT3G28100	
AT1G52000	AT2G15050	AT3G53650	AT5G11670	AT3G14530	AT5G46520	AT1G65150	AT2G16970	AT1G79700	
AT5G56380	AT1G51990	AT2G38240	AT5G45090	AT5G38780	AT3G10650	AT4G01380	AT2G02520	AT1G19394	
AT5G45070	AT2G12190	AT2G11140	AT5G26260	AT5G23060	AT1G68050	AT4G00160	AT2G03750	AT5G46750	
AT1G10220	AT1G12010	AT5G22500	AT1G52190	AT2G35733	AT5G50020	AT5G24870	AT1G33490	AT5G05480	
AT3G09270	AT1G56510	AT5G35950	AT5G50240	AT2G23620	AT4G15400	AT5G23800	AT3G60160	AT1G50560	
AT5G44572	AT2G21080	AT1G36580	AT5G39530	AT5G24140	AT3G44420	AT3G05770	AT1G62540	AT5G24910	
AT1G27540	AT3G11070	AT1G12400	AT5G23830	AT3G46110	AT1G25155	AT3G12820	AT1G25570	AT1G43180	
AT4G19500	AT1G19080	AT2G17690	AT4G15620	AT1G21220	AT4G22235	AT5G15420	AT5G39493	AT1G16445	
AT1G52827	AT4G08593	AT3G02410	AT2G43920	AT5G42580	AT1G66970	AT5G18407	AT3G30730	AT3G02070	
AT5G16980	AT1G59730	AT4G14548	AT1G13270	AT5G42840	AT1G23950	AT5G42650	AT2G12462	AT1G79310	
AT5G22580	AT1G35612	AT4G15920	AT3G43670	AT5G10230	AT3G47010	AT1G02575	AT5G66520	AT1G06570	
AT3G60170	AT4G15330	AT3G15352	AT2G42990	AT3G18070	AT3G17420	AT5G61270	AT1G27570	AT4G27410	
AT1G02020	AT5G51730	AT1G02770	AT3G29252	AT4G19630	AT5G43470	AT1G68240	AT5G11260	AT5G37340	
AT5G54700	AT3G45080	AT3G28220	AT5G07560	AT1G69490	AT3G09310	AT1G18180	AT3G07070	AT1G58400	
AT3G50020	AT1G73325	AT1G49032	AT3G03270	AT5G23395	AT5G02540	AT2G10410	AT5G54064	AT2G23560	
AT5G19070	AT1G23052	AT2G35980	AT3G26445	AT5G46710	AT3G16020	AT3G59000	AT1G19070	AT4G11110	
AT5G65050	AT5G45080	AT5G43210	AT3G27470	AT1G53490	AT5G56370	AT2G24110	AT1G34000	AT5G02460	
AT5G55896	AT5G16340	AT4G24880	AT1G17590	AT2G02000	AT5G40950	AT3G06125	AT4G25530	AT5G27440	
AT1G65370	AT3G48080	AT2G04800	AT3G44590	AT3G47360	AT5G28510	AT1G48260	AT3G49310	AT3G48460	
AT3G29639	AT2G07811	AT5G01335	AT3G26960	AT1G67265	AT3G16030	AT1G52920	AT5G05290	AT5G46780	
AT5G42600	AT1G69550	AT1G72140	AT1G25520	AT2G11150	AT3G44670	AT4G10080	AT4G12550	AT3G04710	
AT3G06660	AT2G12480	AT5G33370	AT5G42510	AT2G25355	AT3G46030	AT5G47980	AT5G64480	AT4G12440	
AT4G36515	AT4G01590	AT4G37310	AT5G23030	AT3G60972	AT2G13690	AT3G24360	AT5G54190	AT3G15640	
AT5G58770	AT4G27560	AT3G25770	AT4G00430	AT2G22990	AT1G14120	AT1G36680	AT1G23060	AT5G01840	
AT1G60525	AT5G24780	AT5G23410	AT1G65520	AT3G22940	AT1G62590	AT1G02220	AT5G53150	AT5G28350	
AT2G41440	AT1G23130	AT3G11370	AT5G46330	AT3G25830	AT3G44600	AT4G28710	AT5G52470	AT1G23020	
AT1G52347	AT3G47250	AT2G42170	AT4G15165	AT1G29180	AT2G05812	AT2G35830	AT3G50440	AT5G52050	
AT2G22821	AT3G43833	AT4G15910	AT5G43516	AT5G22520	AT2G29420	AT1G23040	AT4G07820	AT3G18280	
AT3G14650	AT2G10606	AT3G46700	AT2G19900	AT3G28060	AT3G20935	AT2G22860	AT3G06950	AT3G22680	
AT5G03090	AT2G19980	AT5G37410	AT2G14880	AT3G55130	AT4G27020	AT1G49490	AT3G26480	AT5G60250	
AT4G08940	AT1G23935	AT1G70720	AT2G22420	AT1G52100	AT1G59660	AT5G52547	AT5G03545	AT5G22555	
AT5G26290	AT3G05625	AT1G25211	AT1G24370	AT4G11410	AT1G11175	AT1G27170	AT3G51620	AT3G11630	
AT1G25150	AT4G00970	AT1G65670	AT4G29760	AT5G57270	AT3G20395	AT3G29780	AT1G60505	AT4G23700	
AT2G46490	AT1G54260	AT5G26200	AT3G61930	AT4G15475	AT3G05160	AT4G01026	AT5G34830	AT4G13493	
AT4G11460	AT3G60150	AT1G25230	AT5G05690	AT3G49780	AT4G22233	AT3G12170	AT5G37400	AT1G80740	
AT2G18193	AT5G57785	AT1G65190	AT4G29690	AT4G19510	AT1G07705	AT3G46650	AT5G03310	AT5G20550	
AT3G30720	AT5G27927	AT1G29090	AT3G52830	AT1G34240	AT3G11110	AT4G15260	AT3G20705	AT1G31190	
AT1G67365	AT5G53990	AT5G46490	AT5G24206	AT1G63900	AT4G15340	AT5G02350	AT1G32900	AT1G50090	
AT3G45140	AT4G11000	AT4G24415	AT4G22200	AT1G63090	AT3G44630	AT2G04100	AT1G12020	AT5G11270

Fig. 2 GO annotation classification of DEGs. The fractions of cellular components, biological processes, and molecular functions were calculated based on the number of GO terms. The fractional ratios of the biological processes were calculated based on the number of GO-slim from the TAIR database

Fig. 3 GO enrichment and interactive network analysis of DEGs. Interactive graph of the biological processes of DEGs related to BR activation. The network was summarized and plotted following the published REVIGO protocol (<http://revigo.irb.hr>)

석 기술의 발전속도에 비해 유전자의 기능을 연구하는 기능유전체학의 발전이 상대적으로 빈약하기 때문에 파악된다. 또한 그 밖의 약 50%의 유전자들은 단백질 대사, 발달, 전사 및 번역, 신호전달에 관여하는 유전자들로 구성되어 있었다. 이 중 16% 정도는 스트레스 반응에 관여하는 유전자군으로 나타났으며, 이들 유전자의 역할에 매우 관심을 갖게 한다(Fig. 2). 이러한 결과를 통해 브라시노스테로이드 신호전달이 다양한 스트레스 반응과 아주 밀접하게 연관되어 있음을 시사하고 있다. 몇몇 보고에서도 식물의 성장과 정상에서 브라시노스테로이드 처리가 광범위 스트레스 내성 증대에 밀접한 관계가 있다고 하였다(Divi and Krishna 2009; Gendron and Wang 2007). 또한 분리된 GO term을 좀더

생물학적 기능과 연관시켜 GO 상호작용 네트워크를 분석한 결과 브라시노스테로이드 신호전달에 의해 활성화될 때 알려진 embryo development, seed development, cell differentiation, reproductive, fruit development, gametophyte development 등 식물 발육 과정에서 밀접하게 관련되는 것들이 분리되었다(Fig. 3). 또한 cellular biosynthesis, 아미노산 대사, 핵산 대사, 2차 대사산물 합성 경로 등과 같은 대사에 관련된 유전자들의 그룹이 연관성을 보이는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이전의 브라시노스테로이드의 연구에 있어서 외부로부터 자극원으로 처리가 되면, 식물의 성장과 발육과정상에 다양한 신호전달 및 호르몬과의 상호작용을 하여 스트레스 내성 및 표현형의 변화를 보인다고 하였다 (Choudhary et al.

Table 3 List of up-regulated DEGs related to stress responses

Stress-related / UP-regulated gene list(98)			
Gene	Annotation	Gene	Annotation
AT1G72930	AtTN10 (toll/interleukin-1 receptor-like)	AT4G16890	SNC1 (SUPPRESSOR OF NPR 1-1, CONSTITUTIVE 1)
AT3G60950	C2 calcium/lipid-binding endonuclease/exonuclease/phosphatase	AT1G32920	unknown protein
AT5G45490	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	AT5G56590	O-Glycosyl hydrolases family 17 protein
AT2G05830	MTI1 (NagB/RpiA/CoA transferase-like superfamily protein)	AT1G61490	S-locus lectin protein kinase family protein
AT1G61180	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein	AT5G23570	ATSGS3 (SUPPRESSOR OF GENE SILENCING 3)
AT4G22210	LCR85 (low-molecular-weight cysteine-rich 85)	AT1G73120	unknown protein
AT4G23290	CRK21 (cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 21)	AT5G40170	AtRLP54 (receptor like protein 54)
AT2G20180	`	AT1G12220	RPS5 (RESISTANT TO P. SYRINGAE 5)
AT4G14630	GLP9 (germin-like protein 9)	AT4G12020	ATWRKY19/MAPKKK11 (MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE KINAE KINASE 11)
AT5G25250	FLOT1 (FLOTLIN 1)	AT2G23600	ACL (acetone-cyanohydrin lyase)
AT4G23300	CRK22 (cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 22)	AT4G17260	Lactate/malate dehydrogenase family protein
AT4G15210	AT-BETA-AMY (beta-amylase 5)	AT2G18170	ATMPK7 (MAP kinase 7)
AT2G02120	LCR70 (LOW-MOLECULAR-WEIGHT CYSTEINE-RICH 70)	AT5G33355	Defensin-like (DEFL) family protein
AT5G37940	Zinc-binding dehydrogenase family protein	AT1G24020	MLP423 (MLP-like protein 423)
AT5G02500	ATHSC70-1 (heat shock cognate protein 70-1)	AT1G16880	ACR11 (ACT DOMAIN REPEATS 11)
AT2G05117	SCR19 (SCR-like 9)	AT4G37370	CYP81D8 (cytochrome P450, family 81, subfamily D, polypeptide 8)
AT3G57260	AtBG2 (beta-1,3-glucanase 2)	AT2G21195	unknown protein
AT1G50290	unknown protein	AT4G02550	unknown protein
AT1G72920	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain family protein	AT3G50880	DNA glycosylase superfamily protein
AT5G27100	ATGLR2.1 (glutamate receptor 2.1)	AT4G30660	Low temperature and salt responsive protein family
AT5G37980	Zinc-binding dehydrogenase family protein	AT2G40300	ATFER4 (ferritin 4)
AT5G43940	HOT5 (SENSITIVE TO HOT TEMPERATURE 5)	AT3G45680	NPF2.3
AT3G59930	Encodes a defensin-like (DEFL) family protein	AT1G61420	S-locus lectin protein kinase family protein
AT4G16950	ADH2 (GroES-like zinc-binding dehydrogenase family protein)	AT5G44030	CESA4 (cellulose synthase A4)
AT5G38000	RPP5 (Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family)	AT4G09320	ATNDK1 (Nucleoside diphosphate kinase 1)
AT5G28000	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	AT2G21620	RD2 (RESPONSIVE TO DESICCATION 2)
AT4G19520	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	AT3G21090	ABCG15 (ATP-BINDING CASSETTE G15)
AT4G19030	AT-NLM1 (NOD26-like major intrinsic protein 1)	AT4G19700	BOI (BOTRYTIS SUSCEPTIBLE1 INTERACTOR)
AT5G44430	PDF1.2c (plant defensin 1.2C)	AT4G09420	Disease resistance protein (TIR-NBS class)
AT5G28010	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	AT4G23310	CRK23 (cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 23)
AT5G40910	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	AT3G20130	CYP705A22 (cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 22)
AT5G20630	ATGER3 (germin 3)	AT2G03390	uvrB/uvrC motif-containing protein
AT1G35680	RPL21C (Chloroplast Ribosomal protein L21)	AT1G16030	Hsp70b (heat shock protein 70B)
AT5G10760	AED1 (APOPLASTIC, EDS-1DEPENDENT 1)	AT2G40340	AtERF48
AT3G60980	Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein	AT5G43570	Predicted to encode a PR (pathogenesis-related) peptide
AT1G05680	UGT74E2 (Uridine diphosphate glycosyltransferase 74E2)	AT3G43440	JAZ11 (jasmonate-zim-domain protein 11)
AT4G31990	ASP5 (aspartate aminotransferase 5)	AT4G36930	SPT (SPATULA)
AT5G41740	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	AT4G23270	CRK19 (cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 19)
AT5G18360	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	AT5G09810	ACT7 (actin 7)
AT2G14820	MEL3 (MAB4/ENP/NPY1-LIKE 3)	AT2G28830	AtPUB12 (PLANT U-BOX 12)
AT2G23960	Class I glutamine amidotransferase-like superfamily protein	AT1G64780	AMT1;2 (ammonium transporter 1;2)
AT5G37890	SINAL7 (SINA LIKE 7)	AT5G49520	ATWRKY48 (WRKY DNA-binding protein 48)
AT5G46470	RPS6 (disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family)	AT5G46260	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT3G51660	Tautomerase/MIF superfamily protein	AT1G50180	NB-ARC domain-containing disease resistance protein
AT4G22212	Encodes a defensin-like (DEFL) family protein	AT2G35690	ACX5 (acyl-CoA oxidase 5)
AT1G33970	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein	AT2G26560	PLA IIA (phospholipase A 2A)
AT5G58120	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	AT5G45000	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT3G45290	ATMLO3 (Seven transmembrane MLO family protein)	AT2G14080	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT4G12000	SNARE associated Golgi protein family	AT1G03850	ATGRXS13 (Glutaredoxin 13)

Table 4 List of down-regulated DEGs related to stress responses

Stress-related / DOWN-regulated gene list(105)			
Gene	Annotation	Gene	Annotation
AT3G16450	JAL33(JACALIN-RELATED LECTIN 33)	AT3G49620	DIN11 (DARK INDUCIBLE 11)
AT5G25980	BGLU37(BETA GLUCOSIDASE 37)	AT4G00430	PIP1;4 (4(plasma membrane intrinsic protein 1;4)
AT2G26740	ATSEH(soluble epoxide hydrolase)	AT1G25520	Uncharacterized protein family (UPF0016)
AT5G45070	AtPP2-A8(phloem protein 2-A8)	AT5G23060	CaS(calcium sensing receptor)
AT1G52827	ATCDT1(cadmium tolerance 1)	AT2G22420	Peroxidase superfamily protein
AT5G16980	Zinc-binding dehydrogenase family protein	AT1G45616	AtRLP6(receptor like protein 6)
AT4G19500	nucleoside-triphosphatases	AT1G59620	CW9(Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family)
AT5G65050	AGL31(AGAMOUS-like 31)	AT4G19630	winged-helix DNA-binding transcription factor family protein
AT3G50020	Serine protease inhibitor, potato inhibitor I-type family protein	AT2G23620	ATMES1(methyl esterase 1)
AT4G08940	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family protein	AT3G16030	CES101 (CALLUS EXPRESSION OF RBSC 101)
AT4G11460	CRK30(cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 30)	AT1G68050	ADO3(flavin-binding, kelch repeat, f box 1)
AT5G51630	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	AT3G25830	ATTPS-CIN(terpene synthase-like sequence-1,8-cineole)
AT1G31170	ATSRX(sulfiredoxin)	AT5G10230	ANN7(annexin 7)
AT3G45140	ATLOX2(lipoxygenase 2)	AT4G19510	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)
AT1G65040	AtHrd1B	AT2G01830	AHK4(ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE 4)
AT1G56510	ADR2(Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class))	AT3G44670	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT3G48080	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein	AT1G35515	HOS10(high response to osmotic stress 10)
AT5G45080	AtPP2-A6(phloem protein 2-A6)	AT5G61270	PIF7(phytochrome-interacting factor7)
AT1G12010	2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein	AT4G22235	Arabidopsis defensin-like protein
AT1G23130	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein	AT1G34047	Defensin-like (DEFL) family protein
AT5G24780	ATVSP1(vegetative storage protein 1)	AT5G46520	VICTR (VARIATION IN COMPOUND TRIGGERED ROOT GROWTH RESPONSE)
AT1G69550	disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class)	AT5G43470	HRT (HYPERSENSITIVE RESPONSE TO TCV)
AT5G44920	Toll-Interleukin-Resistance (TIR) domain family protein	AT1G27170	transmembrane receptors
AT2G10606	MIR396A (MICRORNA396A)	AT3G44480	COG1 (RECOGNITION OF PERONOSPORA PARASITICA 1)
AT5G24770	ATVSP2(vegetative storage protein 2)	AT5G08590	SnRK2.1 (SNF1-related protein kinase 2.1)
AT4G16920	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	AT3G44630	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family
AT1G63870	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	AT1G18710	AtMYB47(myb domain protein 47)
AT4G00970	CRK41(cysteine-rich RLK (RECEPTOR-like protein kinase) 41)	AT1G52410	TSA1(TSK-associating protein 1)
AT5G47990	CYP705A5(cytochrome P450, family 705, subfamily A, polypeptide 5)	AT5G11260	HY5 (ELONGATED HYPOCOTYL 5)
AT5G57785	unknown protein	AT5G42650	AOS (ALLENE OXIDE SYNTHASE)
AT4G19840	ATPP2-A1(phloem protein 2-A1)	AT3G51450	Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein
AT2G43590	Chitinase family protein	AT5G61590	DEWAX (DECREASE WAX BIOSYNTHESIS)
AT1G58602	LRR and NB-ARC domains-containing disease resistance protein	AT3G60160	ABCC9 (ATP-BINDING CASSETTE C9)
AT3G11010	AtRLP34(receptor like protein 34)	AT4G23600	COR13(CORONATINE INDUCED 1)
AT5G22500	FAR1(fatty acid reductase 1)	AT5G64110	Peroxidase superfamily protein
AT4G15910	ATDI21(drought-induced 21)	AT1G34000	OHP2(one-helix protein 2)
AT1G12400	Nucleotide excision repair, TFIIH, subunit TTDA	AT1G69310	ATWRKY57(WRKY DNA-binding protein 57)
AT4G24415	MIR824A (MICRORNA824A)	AT3G50440	ATMES10(methyl esterase 10)
AT3G25770	AOC2(allene oxide cyclase 2)	AT3G28940	AlG2-like (avirulence induced gene) family protein
AT5G43210	Excinuclease ABC, C subunit, N-terminal	AT1G01520	ASG4(Homeodomain-like superfamily protein)
AT1G72140	Major facilitator superfamily protein	AT1G70870	Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein
AT3G15352	ATCOX17(cytochrome c oxidase 17)	AT5G09978	PEP7(elicitor peptide 7 precursor)
AT5G46490	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	AT3G11630	2-Cys PrxA (2-Cys peroxiredoxin)
AT2G35980	ATNHL10 (ARABIDOPSIS NDR1/HIN1-LIKE 10)	AT2G02470	AL6(alfin-like 6)
AT5G45090	AtPP2-A7(phloem protein 2-A7)	AT1G58400	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family
AT1G59218	Disease resistance protein (CC-NBS-LRR class) family	AT5G52050	ATDXT50 (DETOXIFICATION EFFLUX CARRIER 50)
AT5G42510	Disease resistance-responsive (dirigent-like protein) family protein	AT2G23560	ATMES7(methyl esterase 7)
AT5G45220	Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family	AT4G27410	ATRD26 (RESPONSIVE TO DESICCATION 26)
AT5G23010	IMS3 (2-ISOPROPYLMALATE SYNTHASE 3)	AT4G11110	SPA2(SPA1-related 2)
AT3G46730	NB-ARC domain-containing disease resistance protein	AT5G01840	ATOPF1(ovate family protein 1)
AT5G05690	DWF3(DWARF 3)	AT5G09650	AtPPa6(pyrophosphorylase 6)
AT5G46330	FLS2(FLAGGELLIN-SENSITIVE 2)	AT5G11270	OCP3(overexpressor of cationic peroxidase 3)
AT4G16845	VRN2 (REDUCED VERNALIZATION RESPONSE 2)

Fig. 5 Brassinosteroid activated plants show multiple stress tolerance phenotypes. **A**, Real time quantitative RT-PCR analysis of the expression levels of candidate hub genes identified by microarray and protein interaction network analysis. **B**, Drought stress tolerance phenotype of BR-activated *bzr1-D*. **C**, BR-activated *bes1-D* plants revealed a higher resistance to bacterial pathogens

Table 5 List of primers used in this study

Primer name	Sequence(5' - 3')	Comment
JAZ1 F	GCTAGGAGACGTTCACTTCAAAGAT	JAZ1 Foward
JAZ1 R	CATTTTGTCTGCTTCCGAAGTC	JAZ1 Reverse
TSA1 F	CATCTTCTGGCTGATGCTTCTG	TSA1 Foward
TSA1 R	GTCGCCTCTTTCGCAAAATTC	TSA1 Reverse
NB-ARC F	TGGGCTGGGATTATCTATTCA	NB-ARC Foward
NB-ARC R	GAAGGAATGTGTGGACTTTGTAATAAT	NB-ARC Reverse
TIR F	GAGCTCTTCGCGGATCTT	TIR Foward
TIR R	CATTAACCAATCCATGAGACAGAGA	TIR Reverse
OCP3 F	TGTGGTTCGAACCTAAGGAAAAAGT	OCP3 Foward
OCP3 R	CGTTTCAATGTGAGCTTTCTTCA	OCP3 Reverse
PrxA F	AATGAGAACCCTCCAGGCATT	PrxA Foward
PrxA R	TGGGTCGGGTTTCATTGACT	PrxA Reverse
MLO3 F	GCACTGGCAAGGGATGGTTA	MLO3 Foward
MLO3 R	TTCTTCAGAATCAATATCACCATTG	MLO3 Reverse
FLS2 F	GAATGATGAAGATTCACAAGACATGA	FLS2 Foward
FLS2 R	GAGTTCCATATCAAGAACCCTAACCA	FLS2 Reverse

었다(Fig. 5A). 반대로 *TIR1*, *TSA1*, *OCP3*의 경우 *bes1-D* 계통이 야생형 En-2 계통에 비해 발현이 감소되었다(Fig. 5A). 이러한 결과를 바탕으로 브라시노스테로이드 신호 강도가 증가된 *bzr1-D* 돌연변이를 이용하여 drought 스트레스 내성을 검정한 결과 브라시노스테로이드 증대 식물체에서 약 40%(16개체 샘플 중 6개체 생존)는 drought stress에 대한 저항성을 보였다(Fig. 5B). 그러나 야생형 En-2 식물체는 drought stress에 감수성을 보였다(16개체 샘플 중 0개체 생존). 또한 병원균 저항성을 검정하기 위해 *Pst* DC3000을 접종한 결과

best1-D 계통이 En-2 계통에 비해 저항성을 보였다(Fig. 5C). 최근 들어 시스템 생물학을 이용한 빅데이터 처리를 통해 생명현상을 이해하려는 노력이 최근 다양한 분야에서 사용되고 있으며, Serin 등 (2016)은 전 전사체 분석을 통해 얻어진 많은 양의 데이터를 효율적으로 처리하고, 이를 통해 새로운 생명현상의 모듈을 발견할 수 있는 생명공학적인 기법을 보고하였다. 이런 방법은 신호전달 과정의 연구에서 단일 호르몬 또는 신호전달 체계가 어떻게 이뤄지고 있는지를 이해하는데 큰 역할을 할 수 있지만 단일체계들이 상호적으로 복잡하게 얽혀 있는 생명현상을 이해하는데 많은 장애가 있음을 시사하였다(Serin et al. 2016). 본 연구는 비록 microarray 분석, 시스템생물학 및 유전자의 발현양상 등의 국한적인 기법을 이용하여 브라시노스테로이드 신호전달에 의해 형성되는 다양한 스트레스 저항성 현상을 이해하는데 큰 일조를 하였다고 판단된다. 향후 이러한 연구 기법을 통해 NGS를 통해 얻어지는 빅데이터를 분석하고 이를 통해 식물이 지니고 있는 복잡한 생명현상을 이해할 수 있으리라 사료된다.

적 요

브라시노스테로이드는 식물의 성장과 발육 과정에 있어서

중요한 역할을 담당 할 뿐 아니라 생물학적/ 비 생물학적 스트레스에 대한 복합 저항성을 보인다고 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 브라시노스테로이드와 광범위스트레스 내성을 연결하는 중요한 생물학적 네트워크를 이해하기 위해, Agilent *Arabidopsis* 4 x 44K oligo chip을 이용하여 브라시노스테로이드 신호가 강화된 *bes1-D* 계통의 전 전사체 비교 분석을 수행하였다. 그 결과 *bes1-D* 계통에서 DEGs (Differentially Expressed Genes)를 1,091 (562 up-regulated, 529 down-regulated) 개 선발하였다. 또한 선발된 유전자들의 GO와 단백질 상호작용 네트워크 분석을 통해 대사, 발달, 스트레스, 면역, 방어 반응에 관련된 주요 브라시노스테로이드 신호전달과 연결된 스트레스 관련 유전자군을 분리하였다. 선발된 유전자 중 *NB-ARC*와 *FLS2*는 *bes1-D* 계통이 야생형 En-2 계통에 비해 약 6배 정도의 발현량이 증가되었으며, *TIR1*, *TSAL*, *OCP3* 유전자들은 *bes1-D* 계통이 야생형 En-2 계통에 비해 발현이 감소되었다. 또한 브라시노스테로이드 활성형 계통이 야생형 식물체 계통에 비해 가뭄 스트레스 및 병원균에 대해 저항력이 향상되었다. 따라서 microarray 분석을 통한 유전자 간 발현 네트워크와 유전체 정보를 결합하여 대 단위 주요 기능 유전자들을 동정할 수 있는 방법을 고안하여 실험에 사용하였다. 이를 통해 기능 획득 돌연변이 *bes1-D*가 식물들이 다양한 스트레스 환경에 적응할 수 있는 반응을 조절한다는 사실을 보여주고 있다.

사 사

본 성과물은 농촌진흥청 2016 국가농업 R&D 어젠다 연구 사업 (세부과제명: 과수 주요 병해의 현장 진단 및 생물학적 방제법 개발, 세부과제번호: PJ011917)과 농림축산식품부·해양수산부·농촌진흥청·산림청 Golden Seed 프로젝트 사업 (원예종자사업단, 과제번호 : 213003-04-3-SBY10)의 지원에 의해 이루어진 것임.

References

- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT and others (2000) Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25:25-9
- Choudhary SP, Yu JQ, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Tran LS (2012) Benefits of brassinosteroid crosstalk. *Trends Plant Sci* 17:594-605
- Divi UK, Krishna P (2009) Brassinosteroid: a biotechnological target for enhancing crop yield and stress tolerance. *N Biotechnol* 26:131-6.
- Divi UK, Rahman T, Krishna P (2010) Brassinosteroid-mediated stress tolerance in *Arabidopsis* shows interactions with abscisic acid, ethylene and salicylic acid pathways. *BMC Plant Biol* 10:151
- Gampala SS, Kim TW, He JX, Tang W, Deng Z, Bai MY, Guan S, Lalonde S, Sun Y, Gendron JM and others (2007) An essential role for 14-3-3 proteins in brassinosteroid signal transduction in *Arabidopsis*. *Dev Cell* 13:177-89
- Gendron JM, Wang ZY (2007) Multiple mechanisms modulate brassinosteroid signaling. *Curr Opin Plant Biol* 10:436-41
- Harnsomburana J, Green JM, Barb AS, Schaeffer M, Vincent L, Shyu CR (2011) Computable visually observed phenotype ontological framework for plants. *BMC Bioinformatics* 12:260
- He JX, Gendron JM, Yang Y, Li J, Wang ZY (2002) The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:10185-90
- Kagale S, Divi UK, Krochko JE, Keller WA, Krishna P (2007) Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. *Planta* 225:353-64
- Kim TW, Wang ZY (2010) Brassinosteroid signal transduction from receptor kinases to transcription factors. *Annu Rev Plant Biol* 61:681-704
- Kutschera U, Wang ZY (2012) Brassinosteroid action in flowering plants: a Darwinian perspective. *J Exp Bot* 63:3511-22
- Lee T, Kim H, Lee I (2015a) Network-assisted crop systems genetics: network inference and integrative analysis. *Curr Opin Plant Biol* 24:61-70
- Lee T, Yang S, Kim E, Ko Y, Hwang S, Shin J, Shim JE, Shim H, Kim H, Kim C and others (2015b) AraNet v2: an improved database of co-functional gene networks for the study of *Arabidopsis thaliana* and 27 other nonmodel plant species. *Nucleic Acids Res* 43:D996-1002
- Li J, Chory J (1997) A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell* 90:929-38
- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC (2002) BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 110:213-22
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method. *Methods* 25: 402-408
- Oh E, Zhu JY, Ryu H, Hwang I, Wang ZY (2014) TOPLESS mediates brassinosteroid-induced transcriptional repression through interaction with BZR1. *Nat Commun* 5:4140
- Rhee SY, Dickerson J, Xu D (2006) Bioinformatics and its applications in plant biology. *Annu Rev Plant Biol* 57:335-60
- Ryu H, Cho H, Bae W, Hwang I (2014) Control of early seedling development by BES1/TPL/HDA19-mediated epigenetic regulation of ABI3. *Nat Commun* 5:4138
- Ryu H, Cho H, Kim K, Hwang I (2010a) Phosphorylation dependent nucleocytoplasmic shuttling of BES1 is a key regulatory event in brassinosteroid signaling. *Mol Cells* 29:283-90
- Ryu H, Kim K, Cho H, Hwang I (2010b) Predominant actions of

- cytosolic BSU1 and nuclear BIN2 regulate subcellular localization of BES1 in brassinosteroid signaling. *Mol Cells* 29:291-6
- Ryu H, Kim K, Cho H, Park J, Choe S, Hwang I (2007) Nucleocytoplasmic shuttling of BZR1 mediated by phosphorylation is essential in Arabidopsis brassinosteroid signaling. *Plant Cell* 19:2749-62
- Serin EA, Nijveen H, Hilhorst HW, Ligterink W (2016) Learning from Co-expression Networks: Possibilities and Challenges. *Front Plant Sci* 7:444
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, Amin N, Schwikowski B, Ideker T (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res* 13:2498-504
- Shin SY, Chung H, Kim SY, Nam KH (2016) BRI1-EMS-suppressor 1 gain-of-function mutant shows higher susceptibility to necrotrophic fungal infection. *Biochem Biophys Res Commun* 470:864-9
- Supek F, Bosnjak M, Skunca N, Smuc T (2011) REVIGO summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. *PLoS One* 6:e21800
- Vriet C, Russinova E, Reuzeau C (2012) Boosting crop yields with plant steroids. *Plant Cell* 24:842-57
- Wang ZY, Bai MY, Oh E, Zhu JY (2012) Brassinosteroid signaling network and regulation of photomorphogenesis. *Annu Rev Genet* 46:701-24
- Wang ZY, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, Yang Y, Fujioka S, Yoshida S, Asami T and others (2002) Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Dev Cell* 2:505-13
- Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T, Chory J (2002) BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* 109:181-91